

学校编码: 10384

学号: 20520081151763

分类号\_\_密级\_\_

UDC\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

人类 ARF1 蛋白的重组表达及其与小分子相互作用研究

Study on Recombinant Expression of Human ARF1 and

Interactions between ARF1 and Small Molecules

郑芳芳

指导教师姓名: 赵玉芬 教 授

吴学记 副教授

刘 艳 副教授

专 业 名 称: 化 学 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 6 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 6 月

# **Study on Recombinant Expression of Human ARF1 and Interactions between ARF1 and Small Molecules**

A Thesis Presented

by

Fangfang Zheng

Supervisor: Professor Yufen Zhao

**Submitted to the Graduated School of Xiamen University  
for the Degree of Master of Science**

**June, 2011**

Department of Chemical Biology, Xiamen University

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract .....	III
第一章 绪 论 .....	1
1.1 ADP-核糖基化因子蛋白 .....	1
1.2 hARF1 蛋白质结构特点 .....	2
1.3 hARF1 蛋白的主要功能 .....	5
1.4 生物质谱 .....	7
1.5 本论文的研究意义及主要内容 .....	9
第二章 hARF1 蛋白的重组表达及鉴定 .....	11
2.1 引 言 .....	11
2.2 实验部分 .....	13
2.2.1 实验材料和仪器 .....	13
2.2.2 重组质粒pET28a(+)-hARF1 的构建 .....	19
2.2.3 hARF1 蛋白的表达条件优化及纯化 .....	24
2.2.4 hARF1 蛋白的鉴定 .....	27
2.3 结果与讨论 .....	28
2.3.1 重组质粒的构建及鉴定 .....	28
2.3.2 hARF1 蛋白的表达纯化 .....	31
2.3.3 hARF1 蛋白的表征 .....	34
2.4 本章小结 .....	38
第三章 hARF1 蛋白与小分子相互作用研究 .....	39
3.1 引 言 .....	39
3.2 实验部分 .....	41
3.2.1 实验材料和仪器 .....	41

3.2.2 hARF1 蛋白与嘌呤核苷酸相互作用研究 .....	42
3.2.3 hARF1 蛋白与(+)-Brefeldin A相互作用研究.....	44
3.2.4 丝组二肽对hARF1 蛋白的切割活性研究 .....	47
<b>3.3 结果与讨论.....</b>	<b>48</b>
3.3.1 荧光光谱法和理论计算法研究hARF1 蛋白与GDP/ADP相互作用 .....	48
3.3.2 ITC及X-ray研究hARF1 蛋白(+)-Brefeldin A与相互作用 .....	51
3.3.3 丝组二肽对hARF1 蛋白切割活性的定性分析.....	54
<b>3.4 本章小结 .....</b>	<b>58</b>
<b>第四章 总结与讨论 .....</b>	<b>61</b>
4.1 质粒构建中载体选择 .....	61
4.2 蛋白纯化与鉴定 .....	62
4.3 晶体生长的条件 .....	63
4.4 丝组二肽切割蛋白质研究的若干启示 .....	64
<b>附录 1: 图文索引表 .....</b>	<b>66</b>
<b>附录 2: 缩写索引表 .....</b>	<b>68</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>70</b>
<b>在校期间发表论文 .....</b>	<b>76</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>77</b>

## Contents

<b>Abstract (Chinese)</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1. Preferece</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 The introduction of ARF1</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 The structure of ARF1</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 The main function of hARF 1</b> .....	<b>5</b>
<b>1.4 Biological Mass Spectrometry</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 The significances and main contents of this thesis</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapter 2. Recombinantation and identification of hARF1</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Overview</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Experiment section</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Instruments and reagents.....	13
2.2.2 Construction of recombinant plasmid pET28a(+)-hARF1 .....	19
2.2.3 Optimization of the condition for Expression and purification for hARF1 protein .....	24
2.2.4 Identification of hARF1 .....	27
<b>2.3 Results and discussions</b> .....	<b>28</b>
2.3.1 Construction and Identification of Recombinant plasmid.....	28
2.2.3 Optimization of the condition of Expression and purifitation of hARF1 protein .....	31
2.3.3 Characterization of hARF1 protein.....	34
<b>2.4 Conclusion</b> .....	<b>38</b>
<b>Chaper 3. Study on the reaction of hARF1 and some small molecules</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Overview</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Experiment section</b> .....	<b>41</b>
3.2.1 Instruments and reagents.....	41

3.2.2 Interactions between hARF1 and purine nucleotides. ....	42
3.2.3 Interactions between hARF1 and BFA .....	44
3.2.4 Interaction between hARF1 and Serly-Histidine dipeptide .....	47
<b>3.3 Results and discussions.....</b>	<b>48</b>
3.3.1 Fluorescence spectroscopy and theoretical calculation results of the interaction between hARF1 and purine nucleotides.....	48
3.3.2 Non-covalent interactions between hARF1 and BFA.....	51
3.3.3 The cleavage activity of Serly-Histidine dipeptide on hARF1 .....	54
<b>3.4 Conclusion.....</b>	<b>58</b>
<b>Chapter 4. Summary and discussion .....</b>	<b>61</b>
4.1 Selection of plasmid and construction of vector .....	61
4.2 The key of protein purification and identification.....	62
4.3 The conditions of crystal growth.....	63
4.4 The cleavage activity of Serly-Histidine dipeptide .....	64
<b>Appendix 1 .....</b>	<b>66</b>
<b>Appendix 2 .....</b>	<b>68</b>
<b>References .....</b>	<b>70</b>
<b>Publications .....</b>	<b>76</b>
<b>Acknowledgment.....</b>	<b>77</b>



## 摘 要

腺苷酸核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 是小G蛋白大家庭的一员, 广泛分布于真核细胞中, 并且其结构和功能在物种进化过程中高度保守。其中, ARF1作为ARF蛋白家族总量最大、分布最广的蛋白, 在各种细胞中通过与高尔基体相互作用, 发挥着协助细胞物质运输的功能, 影响着各种疾病的发生发展。

本研究采用分子克隆的方法成功构建人类腺苷酸核糖基化因子1 (human ADP-ribosylation factor 1, 简称hARF1) 重组质粒pET28a(+)-hARF1, 并在大肠杆菌BL21(DE3)中优化表达hARF1蛋白。经 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱和葡聚糖凝胶柱纯化, 通过SDS-PAGE和傅里叶变换高分辨质谱鉴定, 该蛋白纯度可达95%。经过计算, hARF1蛋白的产率5 mg/L菌液, 为后期的蛋白质结构与功能研究准备了材料。

采用紫外光谱法、荧光光谱法、等温量热滴定法、质谱检测法以及理论计算法研究hARF1蛋白与GDP/ADP、布雷菲德菌素A ((+)-Brefeldin A, BFA) 及丝组二肽的相互作用。

利用荧光光谱仪监测发现, 用GDP/ADP滴定hARF1蛋白溶液会产生荧光淬灭现象。根据Stern-Volker方程计算, hARF1蛋白与GDP/ADP弱相互作用的结合常数分别为22694.1 L/mol和7705.6 L/mol。同时利用Chemical Computer公司设计的分子操作环境软件 (Molecular Operating Environment, MOE) 09版的分子对接模块, 模拟嘌呤核苷酸与hARF1蛋白相互作用方式。理论计算结果表明, GDP与hARF1蛋白的结合作用强于ADP与hARF1蛋白。以上结论与细胞内hARF1蛋白选择结合GDP的现象一致。

应用等温滴定量热 (ITC) 法, 用其抑制剂BFA滴定至hARF1蛋白溶液。实验结果表明hARF1蛋白与BFA的结合常数为 $K_a=1429005.5$ , 结合焓 $\Delta H=-10.222548$  kJ/mol, 结合位点数 $n=4.2$ , 二者有中等强度的相互作用。

在Britton-Robinson缓冲液中, 研究丝组二肽对hARF1蛋白的切割活性, 通过SDS-PAGE凝胶电泳发现, 实验组与对照组相比, 随着时间和温度的增加, 实验组的hARF1蛋白发生明显的降解, 说明丝组二肽对hARF1蛋白具有明显的切割活性。利用高分辨质谱解析切割产物, 发现切割产物的分子量多处于1000-2500 Da之间。利用Biotool软件对切割肽段进行序列分析, 发现可疑片段中末端氨基酸除了落在 $\beta$ -片层, 多数是在肽链走向发生改变的Loop区域, 说明丝组二肽倾向于切

割hARF1蛋白的 $\beta$ -片层和无规则卷曲区域。但是，这一结论还有待进一步验证。

**关键词：**hARF1；重组表达；荧光光谱分析；理论计算；相互作用研究

厦门大学博士论文摘要库

## Abstract

ADP-ribosylation factor ((ADP-ribosylation factor, ARF) is a kind of small GTP-binding proteins, which is widely distributed in eukaryotic cells. Its structure and function are highly conserved during species evolution. ARF1 interacts with Golgi apparatus and plays the role of regulator of vesicle trafficking, affecting the development of various diseases.

In this thesis, recombinant plasmid pET28a(+)-hARF1 has been constructed by molecular cloning method, the resulting hARF1 protein has been expressed in *E. coli* BL21(DE3) successfully. The protein is identified by SDS-PAGE and Fourier transform mass spectrometry after being purified by  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography and gel filtration. The result shows protein purity is above 95%, and the yield is 5 mg protein per liter of broth, which is preparing the material for the future research of structure and function.

The interaction between hARF1 proteins and small molecules is detected by UV spectroscopy, fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry (ITC), mass spectrometry and theoretical calculation, respectively.

Monitoring by fluorescence spectroscopy showed that titration of GDP/ADP to hARF1 solution will lead to fluorescence quenching. Calculateing according to Stern-Volker equation, it was found that the interaction between hARF1 and ADP is weaker than that of hARF1 with GDP, which the binding constants are 7705.6 L/mol and 22694.1 L/mol respectively. Further more, the interaction between purine nucleotide and hARF1 is simulated by MOE molecular docking software. Theoretical results show that the binding intensity of ADP and hARF1 is weaker than GDP and hARF1 protein. These conclusions consistent with the phenomenon that hARF1 only binds with GDP in the cells.

Application of ITC method, the interaction between hARF1 and its inhibitor (+)-Brefeldin A (BFA) was investigated. Experimental results show that the binding constant of hARF1 and BFA is 1429005.5, which is moderate intensity.

In order to study the cleavage activity of Seryl-histidine dipeptide (Ser-His), hARF1 and Ser-His were incubated at 37 °C and 50 °C for 60 hours in BR buffer. At the same time, the control experiment without Ser-His was carried out by the same method. From SDS-PAGE results, it was observed that hARF1 was significantly degraded by Ser-His, as time and temperature increased. It means that Ser-His could cleave hARF1. Cleavage products were analyzed by high resolution mass spectrometry, which was found that most of product molecular weight are distributed between 1000 and 2500 Da. Moreover, through analysis the peptide fragments by Biotool software, it was found that most of terminal of the products were in the  $\beta$ -sheet and loop of hARF1.

**Keyword:** hARF1; Recombinant Expression; Fluorescence; Theoretical Calculation; Inverstigation of interaction

## 第一章 绪论

### 1.1 ADP-核糖基化因子蛋白

GTP 结合蛋白, 即 G 蛋白 (GTP binding proteins), 在细胞信号传导途径中起着重要作用。Rodbren 和 Gilman 因发现 G 蛋白获得了 1994 年诺贝尔医学生理学奖, 肯定了 G 蛋白在生物蛋白中的重要地位。G 蛋白一般是指与膜受体偶联的异三聚体 G 蛋白 (heterotrimeric GTP binding proteins), 分子量约 100 kDa 左右, 由  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  三种亚基组成<sup>[1]</sup>。除了与膜受体偶连的 G 蛋白外, 还发现许多在细胞信号传递中扮演着重要角色的其它类型的 GTP 结合蛋白, 它们存在于细胞的不同部位。其中, 一大类分子量约 20 kDa 左右的蛋白称为“小 G 蛋白”(small G-binding proteins)。从人类细胞到酵母, 小 G 蛋白都有广泛的分布。它是一个由 100 多个成员组成的超蛋白家族, 主要包括 Ras、Rho, Rab, Sar/ARF、Ran 等<sup>[2]</sup>。小 G 蛋白的结构类似 G 蛋白的  $\alpha$  亚基, 因此也经常被作为 G 蛋白的进化模型来研究。

腺苷酸核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) 最初是在研究霍乱毒素 (cholera toxin) 的作用机理时发现的 (Schleifer, 1982)<sup>[3]</sup>。它们在序列、结构上与 GTP 酶超家族中的 Ras 家族相似, 所以将其划入其中。ARF 普遍且大量存在于真核生物的细胞中, 除了鼠、牛、人等高等生物, 在诸如啤酒酵母、拟南芥、果蝇、蓝氏贾第虫等低等生物中也有发现, 且结构和功能在动植物演化发展中高度保守。例如: 人和牛的 ARF1 蛋白氨基酸序列 100% 相同, 即使酵母菌 ARF1 与人的也达到 74% 的相似性。另外, 同一物种的不同 ARF 蛋白相似性也达到了 80%~96%<sup>[4, 5]</sup>。

ARF 家族包括 6 个 ARF 蛋白和 11 个 ARF 类蛋白。根据氨基酸序列、分子量大小、基因组成可将 ARF 蛋白分为三类: 第一类包括 ARF1、ARF2 和 ARF3, 由 181 个氨基酸组成的, 是高尔基体相关性 GTP 酶, 它们的主要作用是在细胞的分泌途径上, 调节被膜蛋白复合体结合到出芽的泡膜上; 第二类为 ARF4 和 ARF5, 由 180 个氨基酸组成。ARF4 功能研究较少, ARF5 可能参与从高尔基体到内质网的逆转运; 第三类只有 ARF6, 由 175 个氨基酸组成, 与其他的 ARF 蛋白差别较大, 参与细胞内吞作用和肌动蛋白的重排。这些 ARF 蛋白大多聚集在高尔基体附近<sup>[6, 7]</sup>。

高尔基体将内质网合成的各种蛋白质进行修饰、加工、浓缩、加膜包装，并形成囊泡送达细胞的其他部位或细胞外，通过调节物质运输，对细胞的生长发育发挥着极其重要的作用<sup>[8]</sup>。而ARF在囊泡的运输中起着重要的生理作用，还激活某些重要的酶，参与相关的细胞信号传导。

## 1.2 hARF1蛋白质结构特点

从美国国立生物技术信息中心（NCBI）库搜索得到人类 ARF1（以下简称 hARF1）蛋白序列如下：

```

MGNIFANLFK    GLFGKKEMRI    LMVGLDAAGK    TTILYKLKLG
EIVTTIPTIG    FNVETVEYKN    ISFTVWDVGG    QDKIRPLWRH
YFQNTQGLIF    VVDSNDRERV    NEAREELMRM    LAEDELRLDAV
LLVFANKQDL    PNAMNAAEIT    DKLGLHSLRH    RNWYIQATCA
TSGDGLYEGGL    DWLSNQLRNQ    K

```

运用软件 Vector NTI 对 hARF1 蛋白一级结构进行分析，结果显示其物理、化学参数如下：hARF1 蛋白有 181 个氨基酸；蛋白理论相对分子质量 20695.56；理论等电点 6.36；吸光系数 1.41 L/(g · cm)；中性条件下的电负性为-0.96。

表 1.1 hARF1 蛋白氨基酸组成

Amino Acids	Number count	% by weight	% by frequency
Charged (RKHYCDE)	62	35.72	30.69
Acidic (DE)	23	12.14	11.39
Basic (KR)	23	13.90	11.39
Polar (NCQSTY)	47	23.03	23.27
Hydrophobic (AILFWV)	70	34.10	34.65
A Ala	12	4.02	5.94
C Cys	1	0.46	0.50
D Asp	11	5.50	5.45
E Glu	12	6.63	5.94
F Phe	8	4.97	3.96
G Gly	17	4.80	8.42

H His	10	5.83	4.95
I Ile	11	5.42	5.45
K Lys	11	6.04	5.45
L Leu	23	11.34	11.39
M Met	8	4.49	3.96
N Asn	13	6.45	6.44
P Pro	4	1.73	1.98
Q Gln	7	3.84	3.47
R Arg	12	7.86	5.94
S Ser	10	3.95	4.95
T Thr	11	4.92	5.45
V Val	12	5.28	5.94
W Trp	4	3.07	1.98
Y Tyr	5	3.40	2.48
B Asx	24	11.96	11.88
Z Glx	19	10.48	9.41
X Xxx	0	0.00	0.00

hARF1蛋白作为ARF蛋白家族的代表，其关键序列均在其他ARF蛋白中出现。例如，N末端第2位的甘氨酸的氨基作为十四烷基化位点在各ARF蛋白中是高度保守的，该修饰使得ARF容易锚定在细胞的膜结构中发挥作用<sup>[3]</sup>。另外，GTP结合和解离对ARF的活性起着决定性的作用。与其他ARF一样，hARF1蛋白含有与GTP结合（DVGG，NKQD和CAT）和与GTP解离（GXXXXGKT）有关的特征序列<sup>[9]</sup>。同时，我们可以看到，hARF1蛋白中含有一个半胱氨酸，所以在人工构建诱导表达或者动物组织提取的时候容易形成二聚体，需要加入一定量的还原剂来防止二聚体的生成。

hARF1蛋白的二级结构中含有30%的 $\alpha$ -螺旋，一共有8个 $\alpha$ -螺旋，含有55个氨基酸；25%的 $\beta$ -折叠，一共有7条 $\beta$ -片层，含有46个氨基酸。在空间结构上，ARF1蛋白的N末端有一个 $\alpha$ -螺旋，在活性状态，可以插入内质网膜内。同时，与其它G蛋白不同的是ARF1蛋白具有两个相同的效应结构域（effector domain regions）Switch 1和 Switch 2，它们之间有两个 $\beta$ -折叠结构连接，称之为

interswitch<sup>[10]</sup>。在ARF1蛋白被激活过程中，蛋白质结构发生改变，N末端的 $\alpha$ -螺旋延伸，interswitch区域中两个氨基酸残基随之移动，进而实现了ARF1蛋白的激活（图1.1）<sup>[11]</sup>。活性状态的GTP-ARF1复合体与内质网膜结合，从而启动了外被蛋白的装配。

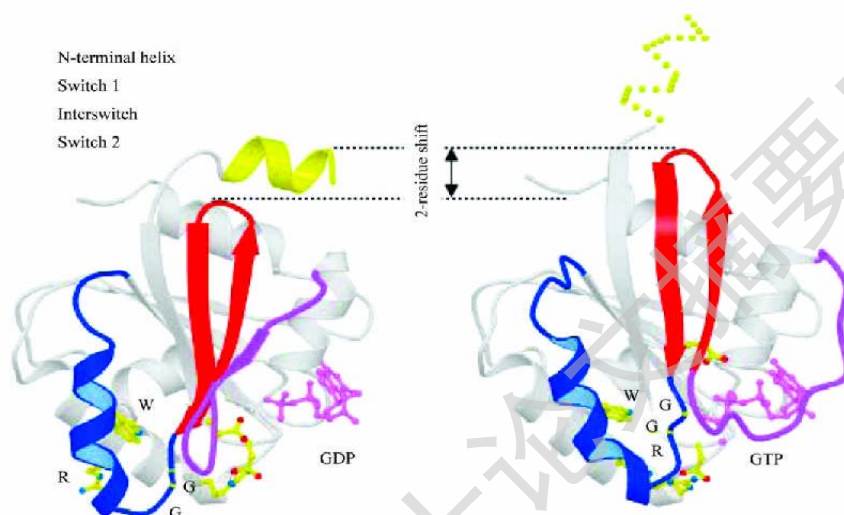


图 1.1 ARF1 蛋白的激活前后三维结构变化示意图

ARF1蛋白是属于G蛋白中的成员，因此它能够与GTP结合变成有活性的状态，同时也能够水解变成GDP结合形式的非活性蛋白，这样ARF1蛋白是以ARF1-GTP和ARF1-GDP相互转化的两种形式存在的。在它们互相转变的过程中，受到两种蛋白的调节，即鸟嘌呤核苷酸交换因子（GTP exchange factors, GEFs）和GDP酶活化蛋白（GTPase activating proteins, GAPs）。对于ARF1蛋白的GEFs，主要功能是催化ARF1蛋白上鸟嘌呤核苷酸的置换，使其由二磷酸鸟苷酸（GDP）结合型转变为三磷酸鸟苷酸（GTP）结合型，从而活化ARF1蛋白。GEFs都含有一个具有催化功能的、保守的、名为Sec7的结构域，由200个氨基酸构成。现在的研究认为GEFs可能是通过相应的“受体”锚定在细胞器的囊膜中，GEFs在催化ARF1蛋白上的GDP释放时，GEFs就与这样的“受体”发生分离<sup>[12]</sup>。对于ARF1-GAPs，它的作用则是将活化的ARF1蛋白上的GTP水解，从而形成非活性的ARF1-GDP。ARF1-GAPs在膜运输中扮演了重要的调节作用<sup>[13]</sup>。

ARF1蛋白的激活及其后与细胞内膜发生作用的整个过程如图1.2所示。首先，细胞中游离的ARF1蛋白接触细胞内膜，连接在N末端 $\alpha$ -螺旋上的十四烷基



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库